

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-253262

(P2002-253262A)

(43)公開日 平成14年9月10日(2002.9.10)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	サーチコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 0 7 K 16/08	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/08		C 1 2 Q 1/70	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/569	L 4 B 0 6 4
C 1 2 Q 1/70		33/577	B 4 B 0 6 6
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 36 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-60462(P2001-60462)

(22)出願日 平成13年3月5日(2001.3.5)

(71)出願人 501028541

株式会社フロンティア・サイエンス  
北海道石狩市新港西1丁目777番地12号

(71)出願人 592113500

株式会社北海道グリーンバイオ研究所  
北海道夕張郡長沼町東5線北15番地

(71)出願人 501088017

杉本 千尋  
北海道帯広市稲田町西2線13番地 畜大宿  
舎5号

(74)代理人 100102141

弁理士 的場 基憲

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体産生トランスジェニック植物

(57)【要約】

【課題】臨床検査現場や、食品加工・検査の現場における、より簡易に実施可能であり、かつ、鋭敏なヒトカリシウイルスの検出手段を提供すること。

【解決手段】抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子を、自己の細胞中に保有する、植物体細胞を作出して、かかる組換え植物体細胞において上記遺伝子を発現させることによって得られる抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体を用いて、ヒトカリシウイルスの検出系を構築することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子を、自己の細胞中に保有する、植物体細胞。

【請求項2】抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子が、抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子を、スパーサー配列を介して結合させた構築遺伝子である、請求項1記載の植物体細胞。

【請求項3】抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子を含む、抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体産生用発現ベクター。

【請求項4】請求項1または2記載の植物体細胞で、全部または一部が構成されている植物体。

【請求項5】請求項4記載の植物体を交配することにより、F1植物体を作出する、植物体の増殖方法。

【請求項6】抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子を、自己の細胞中に保有する、植物体細胞から、または、この植物体細胞で、全部若しくは一部が構成されている植物体から、単離して製造される、抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体。

【請求項7】抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子が、抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子を、スパーサー配列を介して結合させた構築遺伝子である、請求項6記載の抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体。

【請求項8】請求項6または7記載の抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体における抗原抗体反応と、被験物中におけるヒトカリシウイルスの存在とを関連付けて、被験物中のヒトカリシウイルスを検出する、ウイルスの検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウイルスの遺伝子を導入した組換え植物に関する発明であり、より詳細には、ウイルスに対するモノクローナル抗体をコードする遺伝子を導入した組換え植物に関する発明である。

## 【0002】

【従来の技術】ヒトカリシウイルスは、冬季に多発するウイルス性食中毒や乳幼児のウイルス性胃腸炎の原因ウイルスの一つであり、わが国では小型球形ウイルスとも呼ばれてきた。主に、海産物（養殖牡蠣等）が原因となる、本ウイルスによる食中毒が近年増加しつつあり、平成9年には食品衛生法改正により、ヒトカリシウイルスを原因とする食中毒事件票による報告が義務づけられ、

食中毒統計に集計されることとなった。ちなみに、2000年1～11月の厚生労働省統計では、本ウイルスが原因と特定された中毒例は197件、患者数6392人で、これは食中毒全体の発生件数の約1/10、食中毒患者数の1/6を占める数である。

【0003】ヒトカリシウイルスの感染経路は、上述したように、主として海産物を介しての経路であり、具体的には、ウイルスにより汚染された海産物を摂取することにより、ヒトカリシウイルスに感染することが多い。また、ヒトカリシウイルス中毒の患者の便に触れた、手や指を介しても伝播することが知られている。ヒトカリシウイルスは、わずか1～10個のウイルス粒子の侵入によっても感染が成立し得るほど、感染力が強い。

【0004】このような状況にもかかわらず、ヒトカリシウイルスの試験管内培養法や実験動物モデル感染系は、未だ確立されておらず、ウイルス検出に一般的に用いられる組織培養法や、マウス等への接種によるウイルス検出や同定が行えないことも、ヒトカリシウイルスの検出を困難にしている。

【0005】現状においても、ヒトカリシウイルス中毒の患者の診断には、電子顕微鏡によるウイルス粒子検出（「ヒトカリシウイルスの検査法について」平成11年2月10日厚生省衛食20号、衛乳28号）が行われているが、この検出法には、 $10^6$  個/mL以上のウイルス濃度が必要であり、検出感度が高いとはいえない。また、形態的にウイルス粒子が検出されても、ヒトカリシウイルスと直ちに同定できるわけではない。

【0006】そこで、遺伝子増幅反応であるPCR反応による、ウイルス遺伝子の同定を行うことによる、ヒトカリシウイルスの検出が行われている（「ヒトカリシウイルスの検査法について」平成11年2月10日厚生省衛食20号、衛乳28号）。食中毒の原因食物中のウイルスは、一般に、きわめて低濃度であるため、現状では、このPCR反応による検出法が、唯一のカリシウイルスの鋭敏な検出法である。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、まず、電子顕微鏡を用いる方法においては、上述したような問題点の他に、電子顕微鏡が高額であることと、ウイルス粒子の同定に関して、熟練した技術者が必要であること等の問題点が認められる。

【0008】また、PCR反応を用いた方法においては、遺伝子増幅検出装置が高額で、判定結果を得るまで時間がかかり、検査法が複雑で熟練した技術者を要すること等の問題点が認められる。

【0009】よって、臨床検査現場や、食品加工・検査の現場からは、より簡易に実施可能であり、かつ、鋭敏なヒトカリシウイルスの検出手段が提供されることが望まれている。本発明が解決すべき課題は、まさに、この検出手段の提供にある。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、この課題の解決にむけて、ヒトカリシウイルスに対する抗体を作出して、これを用いたウイルス検出手段を提供することを目指すこととした。

【0011】しかしながら、ポリクローナル抗体の場合、動物の個体差、免疫方法の違いにより、抗体の力価、反応性にばらつきが生ずるため、常に一定品質の抗体を獲得することは困難である。また、モノクローナル抗体を製造する場合、免疫原を純系マウスに接種して、その腹水を採取して製造するか、ハイブリドーマの培養により製造するため、大量かつ低価格に製造することが、一般には困難である。特に、マウスを抗体の製造段階において用いる、ポリクローナル抗体の製造や、モノクローナル抗体の腹水からの製造は、動物愛護の観点から、非常に困難になっている。

【0012】本発明者は、植物細胞に、ヒトカリシウイルスに対するモノクローナル抗体をコードする遺伝子（少なくとも、ヒトカリシウイルスに対するモノクローナル抗体であることが特徴付けられている、モノクローナル抗体の可変領域をコードする遺伝子を含むことが必要である）を導入して、この植物細胞を大量培養等することにより、上記の抗体の製造に関わる問題点を解決すること、すなわち、使用範囲が広く、かつ、簡便で技術応用が容易な、コストパフォーマンスが極めて高い抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体を提供することが可能ではないかと考えた。

【0013】すなわち、本発明は、抗ヒトカリシウイルスモノクローナル抗体（以下、抗カリシ抗体ともいう）をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子を、自己の細胞中に保有する、植物体細胞（以下、本植物体細胞ともいう）を提供する発明である。

【0014】一般に、抗体分子は、H鎖およびL鎖と呼ばれる2分子が、ジスルフィド結合により共有結合することで完成分子となり、H鎖およびL鎖中に各3箇所存在する抗原結合領域が、空間的に正しく配置されることにより、抗原との特異的結合性が発揮される。従って、抗体をコードする遺伝子を導入した動植物の細胞内で、所望する抗原結合活性を持った抗体を組換え蛋白質として発現させるためには、H鎖およびL鎖が1:1のモル比で会合し、かつ抗原結合部位の立体構造が正しく再現されることが必要になる。

【0015】H鎖およびL鎖を正しく会合させ、抗体分子の立体構造を正しく再現するため、両鎖をコードする遺伝子をスペーサー配列を介して結合させた、一本鎖遺伝子として合成した構築遺伝子を、各種遺伝子発現系に導入し、H鎖およびL鎖を融合蛋白質（一本鎖抗体）として発現させる技術が、抗原結合活性を持った抗体分子の作出に有効であることが知られている。

【0016】かかる点から、本発明は、本植物体細胞の一態様として、抗カリシ抗体をコードする遺伝子のうち、少なくとも、その可変領域をコードする遺伝子が、抗カリシ抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子を、スペーサー配列を介して結合させた構築遺伝子である、本植物体細胞をも提供する。

【0017】ヒトカリシウイルス（以下、特に断わらない限り、「カリシウイルス」とは、ヒトカリシウイルスを意味するものとする）は、主にポリメラーゼ遺伝子の塩基配列からGenogroup I (Norwalk-like virus), Genogroup II (Snow Mountain-like virus), Genogroup III (Sapporo-like virus)の3種の遺伝子型に分類されてきた。血清型を規定する構造蛋白質遺伝子に基づく分類でも、この3群に分類されるが、さらにGenogroup Iに4血清型、Genogroup IIに7血清型、Genogroup IIIに3血清型が存在すると考えられる。

【0018】すでに、カリシウイルスにおいてはモノクローナル抗体が作出されており、これらがウイルスの抗原型を決定するのに有効であることが報告されている。しかしながら、本発明のように、カリシウイルスに対するモノクローナル抗体を、モノクローナル抗体をコードする遺伝子を導入した植物細胞を基に製造した例は、報告されていない。

## 【0019】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明において、植物を形質転換するための遺伝子の供給源となる、抗カリシ抗体産生細胞は、一般に、ミエローマ細胞とカリシウイルス抗原で動物を免疫して得た免疫細胞とを融合させて得られるハイブリドーマ細胞であり、かかるハイブリドーマ細胞において産生される抗体は、カリシウイルスカプシド抗原に対して結合性を有するモノクローナル抗体である。この抗体は、現在知られている異なる血清型のカリシウイルスに対して広く交差反応性を示す。

【0020】抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子は、抗体の構成成分であるHeavy鎖（H鎖）、Light鎖（L鎖）の2種類のタンパクをコードする遺伝子からなるが、それら2種類の遺伝子各々で、少なくとも抗原（カリシウイルスカプシド抗原）との結合特異性を規定する「抗体可変領域」をコードする遺伝子が含まれていることが必要である。また、この遺伝子（抗カリシ抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子）を、スペーサー配列を介して結合させた構築遺伝子とすることが好適である。

【0021】まず、上記のハイブリドーマ細胞は、カリシウイルスを免疫原として免疫したマウス等の免疫動物より、脾臓細胞を調製し、免疫動物の骨髓腫細胞（ミエローマ）と試験管内で細胞融合して調製され得るものである。このハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体は、カリシウイルス特異的に結合し、かつ

異なる血清型のカリシウイルスに対して広く交差反応性を示すので、多くの種類のカリシウイルスを認識することが可能であり、これを用いて効率的にカリシウイルス感染症に対する診断を行うことが可能である。

【0022】抗カリシ抗体をコードする遺伝子のクローニングは、通常公知の方法により行うことができる。例えば、上記の抗カリシ抗体を産生するハイブリドーマ細胞（抗カリシ抗体産生細胞）よりRNAを分離し、この遺伝子RNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、このcDNAを用いて抗カリシ抗体をコードする遺伝子をクローニングすることができる。

【0023】抗カリシ抗体産生細胞のRNAの分離は、通常公知の方法によって行うことができる。例えば、抗カリシ抗体を産生するハイブリドーマ細胞を試験管内で培養し、このハイブリドーマ細胞から遺伝子RNAを、フェノール法、グアニジン・ホットフェノール法等の通常公知のRNA抽出方法を用いて抽出することにより、抗カリシ抗体産生細胞のRNAを分離することができる。

【0024】この遺伝子RNAを鋳型にしたcDNAの合成も、通常公知の方法を用いて行うことができる。例えば、逆転写酵素を用いて、得られた抗カリシ抗体産生細胞の遺伝子RNAを鋳型とし、オリゴdTプライマーにより一本鎖cDNAを合成し、調製することができる。

【0025】次に、このようにして得られたcDNAから、抗体遺伝子のH鎖およびL鎖を特異的に増幅するプライマー（すなわち、これらの遺伝子領域近傍の遺伝子に対して相補的な塩基配列を有するプライマー）を用いたPCR法等の遺伝子増幅法により、抗体遺伝子断片群を調製して、これを大腸菌を宿主とする増幅用のベクターに組み込み、さらにこれを適切な宿主中で増幅させて大量に抗体遺伝子を増幅させることができる。ここで用いられ得る増幅用ベクターは特に限定されず、例えば、pUCベクターシリーズ、pGEMベクターシリーズ、pBRベクター、PBluescriptベクター、入フェージベクター等の通常クローニングに用いられる増幅用ベクターを用いることができる。

【0026】このようにして得られたcDNAクローンに組み込まれているDNA断片の塩基配列の確認は、例えば、マキサム・ギルバート法（Maxam, A. and Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977)）、ゲノミクシークエンス法〔Church, G. M. and Gilbert, W.: Genomic sequencing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991-1995 (1984)〕、マルチプレックス法〔Church, G. M., Science 240, 185-188 (1988)〕、サイクルシークエンス法〔Nature, 321, 674 (1988)〕、サンガー法〔Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)〕等の方法を用いて、確認することができる。なお、これらの原理を応用した塩基配列自動解析装置〔例

えば、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI Model 373A（両者ともPERKIN ELMER社製）、ALF DNA Sequencer I（Pharmacia 社製）等〕を用いて塩基配列の確認を行うことも勿論可能である。

【0027】このようにして塩基配列を確認することにより得られる、抗体H鎖およびL鎖遺伝子cDNAクローンを、公知の方法により、スパーサーペプチドをコードする遺伝子、例えば、(Glycine-Glycine-Glycine-Glycine-Serine)×4をコードする遺伝子、を介して人工的に連結し、一本鎖抗体遺伝子として増幅用ベクターに組み込み、さらにこれを適切な宿主中で増幅させて大量に一本鎖抗体遺伝子を増幅させることができる。

【0028】上記の方法で得た一本鎖抗カリシ抗体遺伝子の一部または全部の塩基配列をもとに、いわゆる部位特異的変異法等の通常公知の遺伝子の塩基配列の変更手段を駆使することで、前記の工程により調整した一本鎖抗カリシ抗体遺伝子の塩基配列の一部を改変して、その遺伝子を基に産生され得るタンパク質のアミノ酸配列を変更することも可能である。このような一本鎖抗カリシ抗体遺伝子の一部を人為的に改変した遺伝子を、後述する植物への導入遺伝子として用いることは、本発明の技術的範囲に含まれることを本発明者は認識する。

【0029】次いで、上記のごとくして得られた抗カリシ抗体の遺伝子を植物に導入する前提として、この抗カリシ抗体遺伝子等を植物に導入して、かつ、発現させることが可能な発現ベクター（以下、本発現ベクターともいう）を作出することができる。

【0030】本発現ベクターは、上述したように、抗カリシ抗体をコードする遺伝子を含む、この遺伝子の植物における発現ベクターであり、必須の要素として、抗カリシ抗体をコードする遺伝子を含む遺伝子発現ベクターである。そして、この抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子の他に、必要に応じて、例えば、カリフラワームザイクウイルスの35Sプロモーター、イネアクチンプロモーター、イネワキシープロモーター等の植物で機能するプロモーター配列；例えば、トウモロコシのAc/Dsトランスポゾン、ヒマカターゼのイントロン配列等の植物体内での遺伝子発現調節に関与する配列；例えば、ノパリナーミネーター、35Sターミネーター等のターミネーター配列；大腸菌やアグロバタリウム菌体内での自己複製に必要な複製起源配列等を含みうるものである。また、必要に応じて、細胞局在性移行シグナルペプチド等の遺伝子を融合した遺伝子を含み得る。

【0031】本発現ベクターの具体的な態様は、後述する実施例において記載する。本発現ベクターを用いて、上述の抗カリシ抗体遺伝子を植物に導入し、この植物を形質転換することにより、この植物細胞ないし植物体内で、組み込んだ抗カリシ抗体遺伝子産物、すなわち、抗カリシ抗体を発現させることが、本発明の主要な目的の一つである。

【0032】先ず、上述の抗カリシ抗体遺伝子を導入する対象となる植物は、特に限定されず、例えば、イネ科植物では、イネ（水稻、陸稻）、イタリアンライグラス、ソルガム等を；マメ科植物では、アカクロパー、シロクロパー、アズキ、ダイズ、アルファルファ等を；ナス科植物では、ジャガイモ、タバコ、トマト等を広く例示することができる。

【0033】本発現ベクターを、植物に導入する方法は、通常公知の方法を用いて行うことができる。例えば、アグロバクテリウムによる導入方法〔Horsch, R. B. et al., Science 227, 1229-1231 (1985)、Hiei, Y. et al., Plant J. 6, 271-282 (1994)〕、目的の植物体から通常公知の方法を用いてプロトプラストを調整し、このプロトプラストにエレクトロポレーション法〔Fromm, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824-5828〕、ポリエチレングリコール法〔Zhang, W. and Wu, R. Theor. Appl. Genet 76, 835-840 (1988)〕等を用いる方法、例えば、パーティクルガン法〔Gordon-Kamm, W. J. et al., Plant Cell 2, 603 (1990)〕、組織または胚を本発現ベクターの溶液に浸す方法〔Topfer, R. et al., Plant Cell 1, 133 (1989)〕等を挙げることができる。

【0034】本発現ベクターの導入操作を行った植物細胞群において、抗カリシ抗体遺伝子が組み込まれた植物細胞の選抜は、適切なマーカー遺伝子、又はこれを含んだベクターを同時に植物への導入し、このマーカー遺伝子等が導入された植物細胞群をまず選抜して、抗カリシ抗体遺伝子が導入された植物細胞の存在確率を高める等の補助的な手段を講ずることが好ましい。このようなマーカー遺伝子としては、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、除草剤バスタ耐性遺伝子 (bar 遺伝子) 等を挙げることができる。

【0035】このようにして、抗カリシ抗体遺伝子が組み込まれた、本植物体細胞を製造することができる。次に、本植物体細胞から植物体への再分化方法および増殖方法について説明する。

【0036】上記のように製造した上述の抗カリシ抗体遺伝子を導入した本植物体細胞（群）からの植物体の再分化は、常法を用いて行うことができる。例えば、再生能、分裂能の旺盛な懸濁培養細胞からプロトプラストを分離し、培養する方法〔Yamada, Y. et al., Rice genetic newsletter 2, 94 (1985)〕、アガロースビーズ法とナス培養法〔Kyoizuka, J. et al., Mol. Gen. Genet, 206, 408 (1987)〕、リーフディスク法〔De Block, M. et al., Theor. appl. Genet. 76, 767-774 (1988)〕、チューバーディスク法〔Sheerwan, S. et al., Plant Cell Reports 7, 13-16 (1988)〕等の方法を利用することができるが、これらに限定されるものではない。

【0037】そして、これらの方法により幼植物体を得られた時点で、この幼植物体を馴化用培土等に鉢上げして馴化する等により、所望する植物体（本植物体）を得

ることができる。

【0038】なお、本発明において、植物体とは、植物の根、茎、葉、花、実（種籽）、塊茎を総称するものである。従って本発明植物体の技術的範囲は、抗カリシ抗体遺伝子を導入して作出した種苗のみならず、その収獲物にも及ぶものである。

【0039】また、本発明において、植物体細胞とは、プロトプラスト及びカルスの両者を含むものである。従って、本植物体細胞の技術的範囲には、その植物のプロトプラストおよびカルスの両者が含まれる。

【0040】ここまで述べた一連の本植物体細胞ないし本植物体の作出工程等の具体的な態様については、後述する実施例において説明する。上記の工程を経て作出された本植物体が、自殖、他殖が可能な場合、通常公知の交配手法を用いてF1植物体を作成することが可能であり、本植物体の特徴は、安定して後代に遺伝する。

【0041】次に、上記のようにして得られた、本植物体ないし本植物体細胞からの、本発明に係わる抗カリシ抗体（以下、本抗カリシ抗体ともいう）の製造方法について説明する。

【0042】前述のように、本植物体（本植物体細胞を含む）では、その植物体内で、遺伝子として組み込んだ抗カリシ抗体が発現される。本抗カリシ抗体は、本植物体（本植物体細胞を含む）において、組み込んだ上述の抗カリシ抗体遺伝子が発現している部位であれば、根、茎、葉、花、実（種籽）、塊茎、カルス等、どこの部分であっても、どの分化段階であっても、その原材料として用いることができる。なお、カルスは、通年タンク内で培養できることから、本抗カリシ抗体の抽出材料としては好ましい素材である。

【0043】これらの原材料から、本抗カリシ抗体は、常法により抽出することができる。例えば、これらの原材料を適当な緩衝液とともに磨砕することにより、本抗カリシ抗体の粗抽出液を得ることができる。例えば、これらの原材料を磨砕し、この磨砕液に遠心分離を施し、遠心上清液を得て、上記の粗抽出液とすることができる。次いで、この粗抽出液に硫酸アンモニウム等のタンパク質沈殿剤を加え、目的とする本抗カリシ抗体を沈殿物として得ることができる。

【0044】本抗カリシ抗体の用途によっては、この粗抽出の段階でも目的を達成することができるが、更に高い純度を所望する場合は、透析、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動又はこれらの方法を組み合わせて精製をすることができる。

【0045】例えば、得られた本抗カリシ抗体の沈殿物を、特定の緩衝液に溶解して透析を行い、透析後の試料に対して遠心分離を行い、その上清を陰イオンカラムクロマトグラフィーで分画することで、所望する精製された本抗カリシ抗体を得ることが可能である。

【0046】また、さらに、この陰イオン交換により精製された本抗カリシ抗体を、c-mycTag を使用したアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、精製純度を向上させることが可能である。

【0047】驚くべきことに、本植物体（本植物体細胞を含む）では、カリシウイルスに対するモノクローナル抗体が、本来動物において産生される分子であるにもかかわらず、自然界ではあり得ない非宿主である植物体内で、その遺伝子産物として発現させるのである。

【0048】なお、例えば、カリシウイルスのタンパク質をコードしている遺伝子を、常法を用いてバキュロウイルスベクターに組み込み、昆虫細胞に、この遺伝子を導入して発現させることにより、ウイルス粒子を回収して、バキュロウイルス発現カリシウイルススタンパクとして回収することが可能であり、かかるウイルススタンパクを、本発明に関連する種々の試験等において、標準品として用いることが可能である。

【0049】また、このバキュロウイルスにおいて発現されるカリシウイルススタンパク質を、通常公知の方法で免疫動物に接種することにより、この免疫動物から、カリシウイルスのタンパク質に対する抗体（ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）を得ることが可能であり、かかる抗体を、同様に標準品として用いることができる。

【0050】本抗カリシ抗体に対しては、必要に応じて適切な標識を、常法に従って施すことができる。例えば、酵素（マレイミド法、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法等の酵素標識法が挙げられる）、蛍光色素（フルオレセイン、テトラメチルロダミン、テキサスレッド等）もしくは金コロイド等で、本抗カリシ抗体において標識を行うことができる。これらの標識された抗カリシ抗体も、本カリシ抗体に含まれるものとする。

【0051】上述のようにして製造される、本抗カリシ抗体における、カリシウイルスに対する抗原抗体反応と、被験物中におけるカリシウイルスの存在とを関連付けて、被験物中のヒトカリシウイルスを検出することが可能である（本検出方法）。

【0052】具体的には、固定化若しくは非固定化の未標識または標識本カリシ抗体、標準ウイルス抗原等を駆使して、様々な態様の本検出方法を構築することが可能である。例えば、ELISA法やEIA法等のエンザイムイムノアッセイ法（非競合固相エンザイムイムノアッセイ、非競合均一エンザイムイムノアッセイ、競合均一エンザイムイムノアッセイ、競合固相エンザイムイムノアッセイ等）、RIA法、フローサイトメトリー法、金コロイド法、免疫比濁法、オクタブロメーション法、ウェスタンブロットリング法等の、抗原抗体反応を利用した検出方法において、これらの検出方法に必要な要素を、本発明におけるカリシウイルスに関する要素（本カリシ抗体やカリシウイルスの標準抗原）として、行うことができ

る。

【0053】

【実施例】以下、実施例により、本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲がこれらの実施例により限定されるべきものではない。

A. モノクローナル抗体産生ハイブリドーマからの抗体遺伝子の取得

1. ハイブリドーマの培養と抗体の精製

1996年に、堺家畜衛生試験所の田中智之らにより作製されたモノクローナル抗体産生細胞（NSFG22, NSFG28, NSFG8, NSFG941; Virology vol. 207(1), p252-261, 1996）は、10%（v/v）ウシ胎児血清加RPMI 1640培地（GIBCO社製）で37℃、CO<sub>2</sub> 5%存在下、3～4日間培養した。ハイブリドーマのタイピングは、Mouse monoclonal antibody isotyping kit code RPN29（Amersham Pharmacia biotech, UK）を用いて行った。

【0054】まず、タイピングスティックに抗体が含まれているの培養上清0.5mLとTBS-Tween緩衝液（TBS-T/ 20mM Tris, pH7.6, 137mM NaCl, 0.1%（v/v）Tween 20）4.5mLを加え、室温で15分間反応させた。タイピングスティックは5mLのTBS-Tween緩衝液で2回/5分間洗い、10μLのperoxidase labelled anti-mouse抗体（Kit含有）が入ったTBS-Tween緩衝液5mLの中で15分間室温で反応させた。また、5mLのTBS-Tween緩衝液で2回/5分間洗い、発色反応液（4-chloro-1-naphthol（Kit含有）1滴、H2O2一滴をTBS（Tween 20を含まない）50mLに溶かした溶液）5mLの中で15分間室温で発色させ、蒸留水で反応を停止させた。いずれのハイブリドーマの抗体もIgG1でκ-chainをコードしていることが明らかになった。

【0055】抗体の精製は、マウスの腹腔内で増やしたモノクローナル抗体産生細胞から、Affi-Gel Protein A MAPS II Kit（BIO-RAD, CA）を用いて行った。まず、モノクローナル抗体産生細胞を、数回継代した後、約1×10<sup>7</sup> cells/mLに調製し、あらかじめ、2,4,10,14-テトラメチルペンタデカン（通常プリスタン、和光純薬）0.5mLで前処理した、7日から14日経過したBALB/cマウスに0.5mLずつ接種した。接種後、7日から10日目にマウスの腹水を採取し、硫酸アンモニウムを最終濃度33%（v/v）になるように攪拌しながら加え、10000rpmで15分間の遠心分離（TOMY SRX-200, TA-8ロータを用いた）した。沈殿物をリン酸緩衝食塩水（PBS）で溶かし、4℃で1時間静置した後、Dialysis membrane（size 8, 和光純薬）に入れ、リン酸緩衝食塩水（PBS）中で、4℃で2日間、透析した。3mLのAffi-Gel Protein A agaroseが入った、1×10cm Econo-Column chromatography columnを、20mLの結合緩衝液（pH9）を流した後、粗抗体抽出液をPBSで希

積した溶液を15 mL流した。結合緩衝液を50 mLを通し、カラムを洗った後、20 mLの溶出緩衝液を流し、IgG蛋白を溶出した。精製したIgGは陽性対象として使用した。

【0056】2. mRNAの抽出とcDNAの合成  
上記の操作により得られたモノクローナル抗体産生細胞 ( $5 \times 10^6$ ) に、TriZol (GIBCO) 1 mL を加え激しく攪拌し、室温で5分間静置した後、0.2 mLのクロロホルムを加え、攪拌後、室温で3分間反応させた。

【0057】遠心分離操作 (10000rpm/15分間, TOMY MC-150) を行い、水相を新たなチューブに移した。これに、0.5 mLのイソアミルアルコールを加え、攪拌後、室温に10分間静置した。10000rpmで10分間の遠心分離で沈殿を回収後、70%のエタノールで洗い、風乾し、少量のDEPC処理水に溶解して、抗体遺伝子を含むモノクローナル抗体産生細胞RNA溶液とした。

【0058】上記の操作により得られたモノクローナル抗体産生細胞の全遺伝子RNAを鋳型として、cDNA断片を増幅した。すなわち、1  $\mu$ g のモノクローナル抗体産生細胞のRNAに、逆転写反応緩衝液 (50mM トリス・塩酸 pH8.3、75mM 塩化カリウム、8mM 塩化マグネシウム、10mM チチオスレート、10mM dNTP、50pmol/ligo(dT) 18primer、RNase inhibitor、RAV-2 Reverse Transcriptase 10 U (Takara, Japan) を加え、室温で10分、42°Cで60分間反応させた。この反応産物の一部をPCR反応において用いた。

【0059】3. 抗体遺伝子のPCR検出

抗体遺伝子の増幅のPCR反応には、イムノジーンM (NISSINBO, Japan) のH鎖5' Fab・Fv用 primer (配列番号33~39) とH鎖3' Fv用 primer (配列番号40~43)、または、 $\kappa$ 鎖5' Fab・Fv用 primer (配列番号44~53) と $\kappa$ 鎖3' Fv用 primer (配列番号54) の組み合わせを用いて、各々のハイブリドーマRNAから、それぞれのH鎖と $\kappa$ 鎖遺伝子を検出した。耐熱性DNAポリメラーゼ [PLATINUM TaqDNA Polymerase High Fidelity (GIBCO BRL)] を用い、これに添付の緩衝液および反応試薬を用いて、添付の解説書に記載された方法 (1  $\times$  High Fidelity PCR 緩衝液, 200  $\mu$ M each dNTP mixture, 2mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.2  $\mu$ M each primer, cDNA 500ng, 1 unit PLATINUM Taq High Fidelity) に従って行った。熱反応は、94°C/2分間加熱した後、94°C/30秒、65~55°C/1分 (1サイクルごとに1°Cずつ下げる) 及び68°C/2分間の熱サイクル反応を、10サイクル行った。続いて、94°C/30秒、55°C/1分及び68°C/2分間の熱サイクル反応を、25サイクル行った。最後に、68°Cで5分間伸長反応を行い、PCR反応を終了した。

【0060】上記のPCR反応で増幅されたcDNA断片は、2%アガロースゲルで電気泳動 (100Volt/30min)

し、増幅された約350~400bpサイズのパンドを確認した。その増幅産物を切り出し、GENECLEAN II Kit (BIO101 社、CA) を用いて精製を行った。

【0061】まず、1 mLのsodium iodide 溶液を加え、56°Cで5分間処理しゲルを溶かした後、10  $\mu$ L の glass milk を加え、氷上でDNAと結合させた。2回のNew Wash溶液500  $\mu$ L での洗浄の後、乾燥させ、TE緩衝液30  $\mu$ L に溶かし、56°Cで10分間静置した。12000rpmで5分間、室温で遠心分離 (TOMY MC-150) し不純物を取り除き、精製した。精製した増幅産物は、pGEM-T Easy vector system (Promega 社) を用い、その方法に従ってサブクローニングを行った。T4 DNAリガーゼ (1  $\mu$ L)、pGEM-T Easy ベクター (1  $\mu$ L)、増幅産物 (200ng)、ライゲーション反応緩衝液 (300mM Tris-HCl, pH7.8, 100mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM DTT, 5mM ATP) 1  $\mu$ L を含む10  $\mu$ L の反応液で、16°Cで一晩ライゲーション反応を行った。

【0062】<コンピテントE. coliの調製>超低温 (-80°C) に保存されている大腸菌 (E. coli DH5 $\alpha$ , AD494) をLBアガプレート (GIBCO BRL) にストリークし、37°Cにて一晩培養し、形成させたシングルコロニーをかきとり、250 mLのSOB培地 (Bacto Tryptone 2%, Bacto Yeast extract 0.5%, 10mM NaCl, 2.5mM KCl) に接種した。18°Cに調整したロータリーシェーカー (EYELA UNI ACE SHAKER NCS-1300, TOKYO RIKAKIKAI 社) で培養し (O.D.600=0.6 まで)、10分間冷却した後、4°Cで3000rpmで15分間遠心 (GS-6R Centrifuge, BECKMAN社) し、菌体を回収した。上清を除き、80 mLのTB (10mM PIPES, 15mM  $\text{CaCl}_2$ , 250mM KCl, ナカライ社) に懸濁し、10分間冷却した。また、4°C下、3000rpmで15分間遠心 (GS-6R Centrifuge, BECKMAN社) し、菌体を回収した。上清を除き、20 mLのTBに懸濁し、最終濃度が7%となるようにDMSO (Dimethyl Sulfoxide, ナカライ社) を添加し、10分間冷却した後、分注し、液体窒素液中に保存した。

【0063】ライゲーション後の、プラスミドのコンピテントE. coli (DH5 $\alpha$ 株) への形質転換は次のように行った。10  $\mu$ L のライゲーション反応液にコンピテントE. coli 50  $\mu$ L を懸濁し、氷上で20分間反応させた後、42°Cで2分間処理した。直ちに、LB液体培地 (GIBCO BRL) 1 mLを加え、37°Cで1時間培養した。培養後、LBアガプレート (アンピシリン含有) に播き、37°Cで一晩培養し、形質転換した菌体を選び、LB液体培地 (GIBCO BL) 5 mLに加え、37°Cで一晩培養した。

【0064】クローニングプラスミドの精製は、QIA prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社) を用いた。培養した菌体は、12000rpmで2分間、室温で遠心分離 (TOMY MC-150) し、上清を除き、P1緩衝液250  $\mu$ L、P2緩衝液250  $\mu$ L、N3緩衝液350  $\mu$ L を加え懸

濁した後、14000rpmで10分間、室温で遠心分離 (TOMY MC-150) した。上清を、QIAprepカラムに入れ、12000rpmで1分間遠心 (TOMY MC-150) し、カラムをPE緩衝液750μLで洗った後、TE緩衝液50μLを加え、12000rpmで1分間遠心 (TOMY MC-150) し、プラスミドを精製した。

#### 【0065】4. 塩基配列の解析

得られたプラスミドの内、最低24個/最大90個のクローンを選択し、抗体遺伝子の塩基配列の解析に用いた。

【0066】まず、プラスミドDNA200ng、T7プライマー (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG, PROMEGA 社) またはSP6プライマー (TAT TTA GGT GAC ACT ATA G, PROMEGA社) 1μL、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ReactionKit (PERKIN ELMER社) のBig Dye Terminator RR Mix 4μL 反応液10μLを、PCR (96℃/15秒、50℃/15秒及び60℃/4分間の熱サイクル反応×25サイクル) を行った。反応液に50μLのエタノールを加え、氷上で、20分間静置した後、4℃下、14000rpmで20分間遠心 (KUBOTA1720) し、上清を除き、70%エタノール200μLを加え、4℃下、14000rpmで20分間遠心 (KUBOTA1720) し、不純物を除去して乾燥した。Template Suppression Reagent (ABI PRISM, Applied Biosystems 社) 13μLを加えてサンプルを溶かし、3分間煮沸後、氷上で急冷した。このcDNA断片部分の塩基配列を、サイクルシーケンシング法 (Nature 321,674(1986), 310 Genetic Analyzer, ABI PRISM, PERKIN ELMER 社) により決定し、既報のマウス免疫グロブリン塩基配列との高い相同性から、挿入されているcDNA断片がそれぞれマウスのH鎖 (NSFG22 (配列番号1、2)、NSFG28 (配列番号5、6)、NSFG8 (配列番号9、10)、NSFG941 (配列番号13、14)) とκ鎖 (NSFG22 (配列番号3、4)、NSFG28 (配列番号7、8)、NSFG8 (配列番号11、12)、NSFG941 (配列番号15、16)) 抗体遺伝子であることを確認した。

#### 【0067】5. 一本鎖抗体遺伝子の作成

それぞれのH鎖とκ鎖の抗体遺伝子をリンカー [スベイサー (配列番号19、20)] でつなぐため、また、5'側に、SmaI制限酵素認識部位 (バキュロウイルスと大腸菌での発現の場合、EcoRI) と分泌シグナル配列 (配列番号17、18) を、3'側に、c-myc 抗体認識部位 (タグ、配列番号21、22) とKDELシグナル (配列番号23、24) と制限酵素SacI (バキュロウイルスでの発現の場合はSmaI、大腸菌での発現の場合はHindIII) の認識部位を付加するために、デザインしたプライマーでPCR反応を行った。

【0068】すなわち、各々のH鎖5'末端には分泌シグナル配列が、3'末端にはリンカー (κ鎖の5'末端と35bpがオーバーラップするように) をコードするよ

うに設計したプライマー (NSFG22, NSFG28の場合はVH-leader (22,28) (配列番号55)、NSFG8の場合はVH-leader (8) (配列番号60)、NSFG941の場合はVH-leader (941) (配列番号61) の5'primerとVH-linker (22,28) (配列番号57) の3'primerの組み合わせ) と、各々のκ鎖5'末端には、リンカー (H鎖の3'末端と35bpがオーバーラップするように) が、3'末端にはc-myc 抗体認識部位 (タグ、EQKLISEEDL) とKDELシグナルをコードするように設計したプライマー (NSFG22, NSFG8の場合はVL-linker (22) (配列番号58)、NSFG28の場合はVL-linker (28) (配列番号59)、NSFG941の場合はVL-linker (941) (配列番号62) の5'primerと、NSFG22, NSFG28, NSFG8の場合はVL-Tag (22,28) (配列番号56)、NSFG941の場合はVL-Tag (941) (配列番号63) の3'primerの組み合わせ) と、PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity (GIBCO BRL) と、これに添付の緩衝液および反応試薬を用いて、上記のPCR反応の手順に従って、反応を行った。

【0069】熱反応は、94℃/2分間加熱した後、94℃/30秒、45℃/1分間及び68℃/2分間の熱サイクル反応を、30サイクル行った。PCR反応で増幅されたDNA断片は、2%アガロースゲルで電気泳動 (100V/30min) し、増幅された約400bpサイズのバンドを確認後、切り出し、上記のGENECLEAN II Kit (Bio101 社, CA) を用いて精製を行った。回収したH鎖とκ鎖のDNA断片をPCR方法により、一本鎖化した。

【0070】すなわち、H鎖の5'末端に制限酵素認識部位を設定したプライマー [植物発現系の場合、SmaI (配列番号64)、バキュロウイルスと大腸菌発現系の場合、EcoRI (配列番号67)] と、κ鎖の3'末端に制限酵素認識部位を設定したプライマー [植物発現系の場合、SacI (配列番号65、66)、バキュロウイルス発現系の場合、SmaI (配列番号69)、大腸菌発現系の場合、HindIII (配列番号68)] とリンカーのオーバーラップシーケンスを用い、PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity (GIBCO BRL) と、これに添付の緩衝液および反応試薬を用いて、上記のPCR反応の手順に従って、反応を行った。

【0071】熱反応は、94℃/2分間加熱した後、94℃/30秒、45℃/1分間及び68℃/2分間の熱サイクル反応を、5サイクル行った。続いて、94℃/30秒、55℃/1分間、及び68℃/2分間の熱サイクル反応を、15サイクル行った。最後に、68℃で5分間伸長反応を行い、PCR反応を終了した。PCR反応で増幅されたDNA断片は、2%アガロースゲルで電気泳動 (100V/30min) し、増幅された約400bpサイズのバンドを確認後、切り出し、上記のGENECLEAN II Kit (Bio101 社, CA) を用いて精製を行った。精製した増幅産物は、pGEM-T Easy vector system (Promega 社) を用い、上記の方法に従ってクローニングとコンピテン



トE. coli (DH5 $\alpha$ 株)への形質転換を行った後、QIAGEN Spin Miniprep Kit(QIAGEN 社)を用い、クローニングプラスミドを精製した。

【0072】最低24個の得られたプラスミドにおける抗体遺伝子の塩基配列を、上記の方法で解析した。そして、決定された塩基配列が各々のハイブリドーマのH鎖と $\kappa$ 鎖が正しくリンカーでつながっていること、変異がないことを確認し、それぞれ22+15(配列番号25, 26), 28+19(配列番号27, 28), 8+6(配列番号29, 30), 941+3(配列番号31, 32)と命名した。

【0073】6. バキュロウイルス系での発現  
バキュロウイルスベクターpVL1392(Pharmingen社)は、E. coli DH5 $\alpha$ に、上記の方法で導入して、この大腸菌株を形質転換した後、これを、アンピシリン100 $\mu$ g/mlを含むLB培地5ml中で、37℃下において一夜培養し、菌液から、QIAGEN Spin Miniprep Kit(QIAGEN 社)を用いて、プラスミドDNAを調製した。このpVL1392プラスミドDNA50 $\mu$ Lに、EcoRI 4 $\mu$ Lと添付の緩衝液6 $\mu$ Lを加え、37℃で4時間反応を行い、プラスミド鎖の切断を行った後、1%アガロース電気泳動で分離し、ゲルを切り出し、Gene Cleanで精製して、超純水60 $\mu$ Lに溶解した。このDNA溶液にアルカラインフォスファターゼ(10unit)2 $\mu$ L、添付の緩衝液10 $\mu$ Lおよび超純水28 $\mu$ Lを加え、37℃で30分間反応させた後、フェノールとクロロホルム等量で抽出し、4℃で一晩、エタノール沈殿してDNAを析出させ、70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、これを超純水20 $\mu$ Lに溶解した。pVL1392ベクターに挿入する22+15、28+19、8+6、941+3の一本鎖抗体遺伝子断片DNAは、前記のpGEM-Tベクターを用いて得たプラスミドDNA15 $\mu$ Lを、EcoRI 2 $\mu$ Lで37℃下、4時間反応させて切断した後、1%アガロース電気泳動で分離し、約850bpのバンドを切り出して、Gene Cleanで精製し、超純水20 $\mu$ Lに溶解した。上記で得られたベクターDNA溶液7 $\mu$ Lと挿入するDNA溶液1 $\mu$ L、T4リガーゼ1 $\mu$ Lおよび添付の緩衝液1 $\mu$ Lを混合して、16℃で一晩反応させた。このライゲーション液を用いて、E. coli DH5 $\alpha$ コンピテントセルを形質転換して、得られた菌株約20株について、PCR法で一本鎖抗体遺伝子断片DNAの挿入を調べた。陽性株6株については、プラスミドDNAを調製し、塩基配列を調べて、挿入遺伝子が正方向で、変異のないものを選んだ。

【0074】バキュロウイルスへの一本鎖抗体遺伝子の組み換えは、Baculo Gold Transfection Kit(Pharmingen社)を用いて行い、昆虫由来Sf9細胞を形質転換した。まず、上記で得られたプラスミドDNAを0.22 $\mu$ mのフィルターで滅菌し、その25 $\mu$ L(2~5 $\mu$ g DNAを含む)を、Baculo Gold Transfection Kit5 $\mu$

Lと混合して、5分室温で放置後、添付のTransfection buffer B 1mlを加えて、組み換えバキュロウイルスを作出した。Sf9細胞は、10%ウシ胎児血清を含むGrace培地(Gibco BRL 社)を用いて、28℃下で、数回継代培養した後、2 $\times 10^6$ 個の細胞を5mlの培地に浮遊させ、60mm組織培養用プレート(CELLSTAR, Greiner社)に接種し、28℃で、一晩培養したものを宿主細胞として使用した。Sf9細胞は、古い培地を除き、Transfection buffer Aを1ml加え、そこに、組み換えバキュロウイルス溶液を一滴ずつゆっくり滴下した。28℃で4時間培養した後、新しい培地に交換し、さらに28℃で5日間培養して、感染させた。培養上清を、3000rpmで10分間遠心分離して細胞を除き、組み換えバキュロウイルス液を得た。さらに、Sf9細胞(3.2 $\times 10^6$ 個/5ml)に、上記の低濃度の組み換えバキュロウイルス液300 $\mu$ Lを加えて、3日間、培養した。この操作を数回繰り返して、高濃度の組み換えバキュロウイルス液を得た。

【0075】バキュロウイルスに一本鎖抗体遺伝子が組み換えされているかどうかは、感染培養細胞を3000rpmで、10分間遠心分離して集め、Sepa Gene(三光純薬社)の添付文書に従ってDNAを抽出し、PCR法で確認した。

【0076】Sf9細胞で殖やした組み換えバキュロウイルスは、タンパク質発現の良好な昆虫由来TN5細胞(5 $\times 10^5$  cells/ml)100mlに感染させた。4日後に細胞を回収し、界面活性剤(1% Triton X-305)と蛋白質分解酵素阻害剤(Protease-Inhibitor-Cocktail, Roche 社)を含むPBSTで浮遊させ、10秒間の超音波処理(Astorason, MINOX社)を、6回、氷冷下で行った後、4℃、12000rpmで、2分間、遠心分離し、上清を粗抗体抽出液とした。

【0077】7. バキュロウイルス発現タンパク質の解析

溶液中の一本鎖抗体タンパク質の発現は、感染細胞の一部を少量のサンプルバッファー(0.5M Tris-HCl pH6.8 1ml, 10%SDS 2ml,  $\beta$ -メルカプトエタノール0.6ml, グリセロール1ml, 蒸留水1ml, 1%BPB数滴)に溶かし、100℃で5分加熱後の溶液を、SDS-PAGEおよびウェスタンブロット法で解析した。SDS-PAGE(12%)でのタンパク質の確認は、ゲルを泳動後30分間固定し(50%メタノール、10%酢酸)、Quick-CBB(和光純薬)液で1時間染色した後、余分な色素を蒸留水中で一晩振とうして脱色し、約30キロダルトンのタンパク質の出現を指標に行った。ウェスタンブロット法では、SDS-PAGE(12%)後、ゲルからPVDF膜にブロッティング装置(ホライズプロット、アトー)中で一定電流2mA/cm<sup>2</sup>で、1時間通電して、タンパク質を転写した。その膜を、3%スキムミルク(SM)を含むPBST(0.5% Tween-20含有 PBS)

中で、4℃で一晩ブロッッキング後、1%SM-PBSTで1000倍に希釈した抗c-myc マウス血清 (Resaerch Diagnostics社) 中で、室温で1時間反応させ、PBSTで10分間、3回洗浄後、1%SM-PBSTで1000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG血清中で、室温下、1時間反応させた。3回洗浄後、基質液 (PBST 10 mL 中、ジアミノベンジジン 25  $\mu$ g、塩化コバルト六水和物 15  $\mu$ g、過酸化水素水 10  $\mu$ L を含む) で発色させた。その結果、バキュロウイルス系で抗カリシウイルス一本鎖抗体の発現が確認された。一本鎖抗体分子の精製は、Sephacrose conjugated Mouse anti-cmyc clone (ResearchDiagnostics社) を用いて行った。

#### 【0078】8. 抗体活性測定

発現タンパク質活性の測定に用いる抗原は、国立感染症研究所から分与されたカリシウイルス (Chiba 株) 粒子タンパク質遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを、TN5細胞に感染させた培養上清から調製した。

【0079】まず、TN5細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) 100 mL 当りに組み換えウイルス液 1 mL を加えて、28℃で7日間培養した上清 750 mL を、1450 Orpm で30分間、遠心分離 (TOMY SRX-200, TA-8ロータ) して細胞を除き、さらに100000 g、2時間の超遠心分離 (Hitachi CP80 $\alpha$ ) で得られた沈殿物を、超純水中に溶解した。この粗カリシウイルスタンパク質液を、非連続ショ糖密度勾配溶液 (10%、20%、30%、40%、50%) に重層して、113000 g で1時間、遠心分離し、0.5 mL ずつ分画して、BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE) で、タンパク質量を測定した。20%と30%の境界面にあるタンパク質量の多い画分を集め、52000 rpm で3時間、遠心分離 (Hitachi CS100、RP80AT、Hitachi koki 社) してカリシウイルス様粒子を回収し、少量の超純水で溶解した。精製カリシウイルス様粒子は、タンパク質量を測定し、SDS-PAGE (12%) およびウェスタンブロッティング法で解析した。ウェスタンブロッティング法では、一次抗体にモノクローナル抗体NSFG22 (マウス腹水) の1000倍希釈液を、二次抗体にはHRP標識抗マウスIgG血清の1000倍希釈液を用いた。

【0080】発現一本鎖抗カリシウイルス抗体活性は、抗原との結合性をELISA法で測定した。まず、0.05Mの炭酸ナトリウム緩衝液 (1リットル中、炭酸二ナトリウム 1.59 g、炭酸水素ナトリウム 2.93 g、アジ化ナトリウム 0.2 g、pH 9.6) で1  $\mu$ g/mL濃度に希釈した精製抗原粒子を、ELISA用96穴マイクロプレート (Corning 社) に100  $\mu$ L ずつ分注し、4℃で一晩静置してコーティングした。コーティングしたプレートをPBSTで2回洗浄後、3%SM-PBSTで37℃で2~3時間ブロッッキングした。PBSTで2回洗浄後、2倍希釈系列のバキュロウイルス発現粗抗体抽出液を、各ウェルに100  $\mu$ L ずつ分注し、3

7℃で2時間反応させた。さらにPBSTで3回洗浄後、1%SM-PBSTで1000倍希釈したc-myc 抗体をプレートに分注し、37℃で1時間反応させた。PBSTで3回洗浄後、1%SM-PBSTで1000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG血清中で、室温下、1時間反応させた。このプレートをPBSTで3回洗浄後、基質液 (1リットル中、クエン酸一水和物 6.45 g、リン酸水素二ナトリウム 12水 13.8 g、ABTS 11 mg、過酸化水素水 13  $\mu$ L) 100  $\mu$ L をプレートに添加して、37℃で反応させた。30分後、405 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad model 550 Microplate reader) で測定した。その結果、一本鎖カリシウイルス抗体は、カリシウイルス抗原結合活性を有することが明らかになった (第1図: バキュロウイルスが産生する抗体のカリシウイルスに対する反応性を確認した図面であり、□は、抗体の希釈率に対応した405 nmにおける吸光度を示している)。

【0081】<大腸菌での発現系> 22+15、28+19、8+6、941+3の一本鎖抗体遺伝子断片は、大腸菌発現ベクター Escherichia coli AD494 株) に組み込み、37℃で対数増殖期 (O.D.600=0.6) まで培養した後、最終濃度が1 mMになるようIPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を添加、さらに7時間培養し、菌体を10000 rpm で15分間の遠心分離 (TOMY SRX-200, TA-8ロータ) で集めた。沈殿を界面活性剤 (0.05% TritonX-305) を含むPBS (0.05% PBST) で懸濁し、超音波破砕機 (Astroson, MINOX 社) を用いて、超音波処理 (10秒・6回、氷上) を行い、上述の遠心分離器を用いた遠心分離 (4℃、12000 rpm・30分間) 後、上清を大腸菌可溶性画分、沈殿を不溶性画分とした。各画分における、それぞれの一本鎖抗体分子の発現の確認は、上述のSDS-PAGE法とWestern blot法で行った。Western blot法では、一次抗体として抗c-myc マウスモノクローナル抗体を0.05% PBSTで1000倍希釈したものを室温で1時間反応させ、二次抗体としてペロオキシダーゼ標識抗マウスIgGを0.05% PBSTで1000倍希釈したものを、室温で1時間反応させ、検出した。

#### 【0082】B. 抗カリシウイルスモノクローナル遺伝子のタバコへの導入と発現

##### 1. アグロバクテリウムへの抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子の導入

上記の抗カリシウイルス一本鎖モノクローナル抗体遺伝子 22-5、22+15 (配列番号 25・26)、22-8、および 28+19 (配列番号 27・28) を含む pGEMベクターを、制限酵素 Sma I および Sac I で消化し、一本鎖抗体 cDNA断片を調整した。

【0083】次いで、このcDNA断片を、同様に、制限酵素 Sma I および Sac I で消化した植物発現ベクター pBE2113 (plant cell physiology vol. 37 49-59, 1996) に連結後、このベクターにより大腸菌 HB 1

01株を形質転換した。

【0084】得られた形質転換株から、常法に従い、プラスミドを抽出し、それぞれ、pBECAB22+15 (配列番号25・26のcDNA断片を含むプラスミド)、pBECAB22-5 (pBECAB22+15のcDNA断片のうち、C末端側の4アミノ酸残基をコードする部分を欠失)、pBECAB28+19 (配列番号27・28のcDNAを含む) およびpBECAB28-8 (pBECAB28+19のcDNA断片のうち、C末端側4アミノ酸残基をコードする部分を欠失) の4種類の植物発現用遺伝子を構築した。

【0085】このようにして得られた、4種類の本抗カリシ抗体遺伝子を、凍結溶解による直接導入法によって、*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (Clontech社製) に導入した。

【0086】具体的には、*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404を、50mLのLB液体培地中 (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extracts, 1% 塩化ナトリウム) で、A600の吸光値が、約1.0になるまで28℃で振盪培養した。そして、氷上で冷却後、4℃で3000gの遠心分離 (Kubota RA-6を用いた) を行い、集菌後、1mLの氷冷した20mM塩化カルシウム溶液に浮遊させ、これを、0.1mL毎にエッペンドルフチューブに分注した。

【0087】これに組み換えプラスミドpBECAB22+15、pBECAB22-5、pBECAB28+19およびpBECAB28-8を、各々1μgを加え、液体窒素中で急速に凍結した。次に、得られた凍結細胞を、37℃で溶解した後、5分間静置した。これに、1mLのLB培地を加え、28℃で2～4時間振盪培養した。約10000gで1分間遠心分離 (Kubota KM-15200を用いた) して集菌し、0.1mLのLB培地に浮遊させた後、リファンピシン (100μg/mL)、カナマイシン (25μg/mL) 及びストレプトマイシン (300μg/mL) を含むLB固形培地に広げた後、2～3日間、28℃で培養して、pBECAB22+15、pBECAB22-5、pBECAB28+19またはpBECAB28-8が組み込まれた形質転換菌を得た。

【0088】このようにして得られた、形質転換された *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404は、LB液体培地で28℃下で振盪培養後、4℃で3000gの遠心分離 (Kubota RA-6を用いた) を行い、集菌し、MS液体培地 (Physiol. Plant. 15:473(1962)) 中に浮遊させ、これを植物の形質転換操作に用いた。

【0089】2. アグロバクテリウム法によるタバコへの導入

タバコへの抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子の導入は、上記において作出したアグロバクテリウムを用いて、リーフディスク法により行った。

【0090】まず、タバコ葉を、1%次亜塩素酸ナトリ

ウム溶液で15分間殺菌し、滅菌蒸留水で6回洗浄した。この葉から、殺菌したコルクボーラーで直径約1cmの円形状にくり抜き、リーフディスクとした。このディスクを、上記1. で作出したpBECAB28+19を保有する *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404のMS液体培地懸濁液に15分間浸した。この後、MS固形培地 (3% 蔗糖、0.1μg/mL 6-ベンジルアミノプリン、0.1μg/mL ナフタレン酢酸、B5ビタミン、0.8% 寒天を含む (pH5.7)) 上で、28℃で3日間培養後、ディスクを、抗生物質カナマイシン100μg/mL 及びカーベニシリン500μg/mL (いずれもシグマ社製) を含むMS液体培地で洗浄した。

【0091】洗浄後のディスクは、上記抗生物質を含むMS固形培地 (3% 蔗糖を含む) 上で、25℃下、2週間毎に継代培養した (16時間照明、8時間暗期)。培養4～8週間にディスク表面上にカルスが形成され、さらに継代培養することによりシュートが誘導された。

【0092】このシュートを根本から切り取り、ホルモンを含まないMS固形培地 (3% 蔗糖、カナマイシン50μg/mL、カーベニシリン500μg/mLを含む (pH5.7)) 上に移植し、培養した。2～4週間後に発根してきた植物体は、培養土をいれたポット (径10cm) に移植し、人工気象器の中で栽培した。

【0093】3. 再分化植物体における抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子の導入確認および遺伝子の発現確認

(1) ELISAによる抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子発現の確認  
再分化したタバコの葉を、生重の5倍量のPBS-Tween緩衝液 (135mM塩化ナトリウム、1.5mMリン酸二水素カリウム、2.7mM塩化ナトリウム、0.5% (v/v) Tween20, pH 7.2) で磨砕後、3000gで15分間の遠心分離 (Kubota KS-5000を用いた) により得られた上清を粗汁液とした。この粗汁液を、イムノプレート (Nunc社製、Maxisope) に分注し、4℃で一晩コーティングした。

【0094】コーティングしたプレートをPBS-Tween緩衝液で3回洗浄した。その後、0.05Mの炭酸ナトリウム緩衝液 (1リットル中、炭酸二ナトリウム1.59g、炭酸水素ナトリウム2.93g、アジ化ナトリウム0.2g、pH 9.6) で、5μg/mL濃度に希釈した抗c-mycモノクローナル抗体 (Research Diagnostics, INC社製: マウス由来) を、イムノプレート (Nunc社製、Maxisope) に分注し、室温で数時間静置して反応した。

【0095】反応したプレートを、PBS-Tween緩衝液で3回洗浄後、同緩衝液で400倍希釈した、HRPO標識抗ヤギ由来マウスIgG (ab')<sub>2</sub> 抗体 (CAPE社製) をプレートに分注し、37℃で3時間反応させ

た。このプレートをPBS-Tween緩衝液で3回洗浄後、基質溶液（1リットル中、クエン酸一水和物7g、リン酸一水素ナトリウム12水 23.9g、O-フェニレンジアミン0.5g、過酸化水素水1mlを含む）をプレートに添加して室温で反応させた。反応は、停止液（5%硫酸水溶液）で停止後、492nmの吸光値を、マイクロプレートリーダー（Bio-Rad model 2550 EIA reader）で測定した。その結果、いくつかの再分化タバコ個体で抗カリシウイルスモノクローナル抗体のタンパク質が発現していることが明らかになった〔第2図：縦軸は492nmにおける吸光度であり、例えば、横軸において22-5と示された枠内は、22-5遺伝子から発現した抗体についてのデータであることを示しており、各No. は、組換えタバコの個体No. を示している（他枠も同様の意図で設けている）。Pは、ポジティブコントロールとして用いた大腸菌で発現させた一本鎖抗体についてのデータであり、Cont. は、ネガティブコントロールとして用いた非組換えタバコにおけるデータであり、PBSは、PBSについてのデータを示している〕。

【0096】（2）導入した抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子産物のタバコ体内での転写の確認  
ELISAで反応の認められた、いくつかの個体の葉を、液体窒素存在下で乳鉢を用いてパウダー状に磨砕した。これに、試薬ISOPLANT（ニッポンジーン社製）を、その説明書の記載に従って用い、前記のジャガイモの葉の全RNAの抽出を行った。抽出したRNA4μgを鋳型にプライマー（5'-CCCGGATGGGTGGTCTTGATT-3'：配列番号64）とプライマー（5'-GAGCTCTTACAAATCTTCTCAGA-3'：配列番号66）を用いてRT-PCRを行った。このRT-PCRには、One-step RT-PCR kit（TAKARA社製）を用い、30秒/94℃、30秒/55℃及び1分間/72℃の熱サイクル反応を、35サイクル行った。この熱サイクル反応には、サーマルサイクラー（TAKARA MP-30）を使用した。反応後の試料の一部を、2%アガロースゲル電気泳動した結果、抗カリシウイルスモノクローナル抗体転写産物から増幅されてくる位置にバンドが確認され、これらのタバコ体内で抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子が転写されていることが確認された〔第3図：上記転写産物（28+19）のウェスタン検定における電気泳動像を示している。図中、矢印は、単一鎖抗体の泳動位置を示している。ポジティブコントロールとしては、大腸菌発現一本鎖抗体を用いており、図中（Posi）で示している。ネガティブコントロールとしては、非組換えタバコを用いており、図中（Cont）で示している。1次抗体としては、抗c-myc(9E10) マウス抗体を用い、2次抗体としては、HRPO標識抗マウスIgGヤギ抗体を用いた〕。

#### 【0097】（3）抗体分子の精製

上記のように、抗体遺伝子導入植物からの抗体分子精製抗カリシウイルスマウスモノクローナル抗体可変領域遺伝子をタバコ葉に導入し、発現させて得た抗体分子の精製を行った。

【0098】まず、上記のように抗カリシ抗体遺伝子の転写が認められたタバコの葉に、トリス緩衝液（pH 8.0）を加え、氷上でホモジナイザーを用いて磨砕した。この磨砕した葉抽出液に対して、15000rpm, 30min, 4℃の遠心分離操作を施した。この遠心分離操作により得られた上清に、50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。4℃下で数時間攪拌し、塩析による抗体分子の不溶化を行い、遠心分離により、得られた塩析沈殿画分を回収した。次に、得られた沈殿画分を、トリス緩衝液に懸濁させ、同液に対して透析を行い、溶媒置換を行った。

【0099】この置換された抗体分子を含む溶液を、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、NaClの塩濃度勾配（0.1～1.0M）により、精製された抗体分子溶出画分を得、これをプールした。

【0100】更に、抗体分子を含む精製された画分の精製純度を上げるために、抗体可変領域の遺伝子配列の、3'側に付加したc-myc tag 配列を利用したアフィニティーカラムクロマトグラフィー（クローンテック社製）に供し、pH勾配により精製された抗体分子溶出画分を得、これをプールした。

【0101】以上により、タバコ葉から回収された抗カリシ抗体の精製純度が上昇し、抗体遺伝子導入植物体から、効果的に所望する精製された抗カリシ抗体を得ることができた〔第4図：植物発現抗体の精製結果を、SDS-PAGE後の銀染色で示した図面である。図中、Mは分子量マーカーであり、1はDEAEイオン交換step wiseによる精製画分（0.1M NaCl）であり、2は同（0.2M NaCl）であり、3は同（0.3M NaCl）であり、4は同（0.4M NaCl）であり、5は1～4までをプールして、c-myc Tag Affinity精製画分（Fraction 1）であり、6は同精製画分（Fraction 2）であり、7はタバコ葉とIgGの硫酸沈澱物をTris緩衝液で懸濁したものである〕。

【0102】（4）抗体分子の標識と本抗カリシ抗体を用いたカリシウイルスの検出

#### ①HRP標識抗カリシ抗体の製造

上記（3）において、精製された抗カリシ抗体に、過ヨウ素酸法により、HRPを標識した。すなわち、酵素の糖鎖を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化することにより形成されたアルデヒド基と、抗体のアミノ基を反応させることにより、HRP標識抗カリシ抗体を得た。

【0103】②HRP標識抗カリシ抗体によるELISA法によるカリシウイルスの簡便な検出

上述した、バキュロウイルス発現カリシウイルスを、一定量、96穴マイクロプレートに、塗布することにより

結合された。次に、BSAによるブロッキング操作後、HRP標識抗カリシ抗体を希釈し、反応させた。検出のための基質は、テトラメチルベンチジン（以下、TMBともいう）を用い、450nmで測定した。この結果、バキュロウイルス発現カリシウイルスを結合させたプレートホールには、TMBによる発色が明確に認められた。

【0104】⑤サンドイッチELISA測定系の構築  
①で得たHRP標識抗カリシ抗体を用いて、サンドイッチELISAによる検討を行った。

【0105】まず、①の酵素標識のために使用した未標識の抗カリシ抗体を、1μg/mlになるように希釈し、マイクロプレート表面に結合させた。BSAによりブロッキングを行い、PBS-0.02%Tween 20により洗浄した後、バキュロウイルス発現によるカリシウイルス（前出）を段階希釈し、各マイクロプレートのウェルに加えた。37℃で反応後、洗浄し、①で得たHRP標識抗カリシ抗体を、10μg/mlの濃度に希釈し、反応させた。検出のために用いた発色基質は、TMBで、450nmの吸光度で測定した。

【0106】その結果、抗原濃度依存的に抗カリシ抗体が反応することが示された〔第5図：上記ELISAにより得られた検量線を示している。横軸は、抗原（カリシウイルス）の濃度（右程薄い）を示し、縦軸は450nmの吸光度を示している〕。なお、このようなサンドイッチELISAで用いるマイクロプレートを、例えば、共有結合が可能なものを選択することにより、より高感度な検出を行うことができる。

【0107】④金コロイド標識抗カリシ抗体の製造  
抗体を金コロイド標識することにより、より簡便で、かつ、目視的な検出を行うことが可能であるから、本カリシ抗体の金コロイド標識を試みた。

【0108】まず、塩化金酸を、Milli Q水に懸濁させ、100℃で加熱した。これにクエン酸ナトリウム溶液を添加し、さらに100℃で加熱を行った。最終的に、200mMになるように、炭酸カリウムを加え、pH 9.0の金コロイド溶液とした。この金コロイド溶液に、①で用いたのと同じ未標識の抗カリシ抗体を加え、室温で、10～15分間反応を行った。反応後、遠心分離を行い、未反応の抗体を除去するために、20mM Tris-1%BSA溶液(pH 8.2)を用いて、抗体が結合した金コロ

イドの洗浄を行った。最終的に、この20mM Tris-1%BSA溶液(pH 8.2)に懸濁し、金コロイド標識抗体とした。

【0109】⑥イムノストリップの作成及び検出  
④で得た金コロイド標識抗カリシ抗体を用いて、イムノクロマトグラフィー用テストストリップの作成を行った。

【0110】まず、ニトロセルロース膜を所定の長さに短冊状に切断し、裏打ち用のラミネートを貼りつけた。この膜に、所定の濃度のトラップ用抗カリシウイルス抗体溶液および陽性コントロールとなる抗マウス抗体を各0.5μLスポットした。また、金コロイド標識抗カリシ抗体を塗布するために、ガラスフィルターを膜に合わせて切断し、金コロイド標識抗カリシ抗体溶液を浸透させて、冷風で急速に乾燥させた。この金コロイド標識抗カリシ抗体を塗布したガラスフィルターを、膜の下端から0.5cmのところに貼付した。更に、サンプル吸収用のろ紙を、金コロイド標識抗カリシ抗体を塗布したガラスフィルターに接触するように貼付した。

【0111】0.01%SDS-PBS溶液で希釈したバキュロウイルス発現カリシウイルスを、サンプル吸収用のろ紙に浸透させて、展開させた。室温で、約10～15分程度静置することにより、赤紫を呈したスポットが検出された〔第6図：金コロイド標識抗カリシ抗体を用いたイムノクロマトグラフィーによる検出結果を示した発色像を示した図面である。図中、実線の矢印は、抗マウスIgG（ポジティブコントロール）を塗布した箇所を示し、点線の矢印は、抗カリシ抗体（1）または0.01SDS-PBS（2）を塗布した箇所を示している〕。

【0112】このように、金コロイド標識抗カリシ抗体を使用したイムノクロマトグラフィーによる検出系が構築された。

【0113】

【発明の効果】本発明により、抗カリシウイルスモノクローナル抗体を植物細胞を用いて製造する手段が提供され、かかる抗カリシウイルスモノクローナル抗体を用いた、カリシウイルスの優れた検出手段が提供される。

【0114】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Hokkaido Green-Bio Institute  
<120> Antibody-Forming Transgenic Plant  
<130> PH06

<160> 69

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95  
 Arg Gly Tyr Tyr Glu Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 2

gaggtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatt 60  
 acctgcactg tctctgggtt ctcattaacc agctatgata taagctggat tcgccagcca 120  
 ccaggaaagg gtctggagtg gcttggagta atatggactg gtggaggcac aaattataat 180  
 tcagctttca tgtccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240  
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatatatt actgtgtaag aggttactac 300  
 gagggttact atgctatgga ctactggsgt caaggaacct cagtcaccgt ctctctca 357

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 3

Asp Ile Val Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn  
 20 25 30  
 Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser  
 65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu  
                             85                            90                            95  
 Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
                             100                            105                            110  
 Ala Asp Ala  
                             115

<210> 4  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Calisivirus

<400> 4  
 gatattgtga cgcaggetgc attctccaat ccagtcactc ttggaacatc agcttccatc 60  
 tcctgcaggt ctagtaagag tctcctgcat agtaatggca tcacttattt gtattggtat 120  
 ctgcagaagc caggccagtc tcctcagctc ctgatttate agatgtccaa ccttgccatc 180  
 ggagtcaccag acaggttcag tagcagtggg tcaggaactg atttcacact gagaatcagc 240  
 agagtggagg ctgaggatgt ggggttttat tactgtgctc aaaatctaga acttcctcgg 300  
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaata aaacgggctg atgct 345

<210> 5  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Calisivirus

<400> 5  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly  
   1                            5                            10                            15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Phe  
                             20                            25                            30  
 Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                             35                            40                            45  
 Ala Ala Ser Ser Asn Lys Val Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Val  
                             50                            55                            60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile  
                             65                            70                            75                            80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr  
                             85                            90                            95  
 Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Gly Ala Met  
                             100                            105                            110  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
                             115                            120                            125

<210> 6  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Calisivirus

<400> 6  
 gaggtgcagc ttcaggagtc gggaggagc ttgttacagt ctgggggttc tctgagactc 60  
 tcctgtgcaa ctcttggtt caccctcagt gatttctaca tggagtgggt ccgccagcct 120

ccaggaagg gactggagt gattgctgca agcagtaata aagttaatga ttatacaaca 180  
 gactacagcg tctctgtgaa gggcgggttc atcgtctcca gagacacttc ccaaagcattc 240  
 ctctacctgc agatgaatgc cctgagagct gaggacactg ccatttatta ctgtgcaaga 300  
 gatgttcctt attactacgg tactagcggg gctatggact actgggggtca aggaacctca 360  
 gtcaccgtct cctca 375

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 7

Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Thr  
 20 25 30  
 Tyr Leu His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro  
 85 90 95  
 Tyr Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala  
 100 105 110

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 8

aaaatagttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc 60  
 atgacctgct ctgccacctc aagtgtgaagt tccacttact tgcaactggta ccgacagaag 120  
 ccaggatcct cccccaaact ctggatttat ggcacatcca acctggcttc tggagtccca 180  
 gctcgttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240  
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcacc gttccccgta catgttcgga 300  
 ggggggacca agctggaaat aaaacgggct gatgct 336

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 9

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp He  
 35 40 45



Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Thr Gly Asp Lys Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 10

gaagtgaagc tggaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
 tectgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120  
 catggaaaga gccttgagtg gattggatat atttacccta acaatgggtg tactggctac 180  
 aaccagaagt tcaagagcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atggagctcc acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aacaggggat 300  
 aaacggtggt acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctgc 354

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 11

Asp Ile Val Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn  
 20 25 30  
 Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu  
 85 90 95  
 Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Ala Asp Ala  
 115

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 12

gatattgtga cgcaggtgc atttccaat ccagtcactc ttggaacatc agcttccatc 60  
 tcctgcaggt ctagtaagag tctctacat agtaatggca tcacttattt gtattggtat 120  
 ctgcagaagc caggccagtc tcctcagctc ctgatttata agatgtccaa ccttgccatc 180  
 ggagtcaccag acaggttcag tagcagtggg tcaggaactg atttcacact gagaatcagc 240  
 agagtggagg ctgaggatgt ggggttttat tactgtgctc aaaatctaga acttcctcgg 300  
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgct 345

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 13

Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Met Asn Trp Met Gln Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asn Gly Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asp Thr Ala His  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Lys Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Leu Asp Asp Tyr Asp Asp Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 14

gaggtgaagc tgatggaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaagg cttctggtta ctcatcaacg gactatttta tgaattggat gcagcagagc 120  
 catgaaaga gccttgagtg gattggacgt attaatggtt ataattggtga tactttctac 180  
 aaccagaact tcaaggcaca ggccacatta actgtagaca aatcttctga cacagccac 240  
 atggagctcc ggagcctgac atctaaggac tctgcagtct attattgtgc aagattggat 300  
 gattacgacg acgggacgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val	Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr		
20	25	30	
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile			
35	40	45	
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu			
85	90	95	
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala			
100	105	110	

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 16

gacattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct 60  
 ctttcttgca gggccagcca gattattagc gactacttac actggtatca acaaaaatca 120  
 catgagtctc caagcttct catcaaatat gcttcccaat ccattctctgg gatccctcc 180  
 aggttcagtg gcagtggatc aggttcagat ttactctca gtatcaacag tgtggaacct 240  
 gaagatgttg gattgtatta ctgtcaaat ggtcacagct ttccgctcac gttcgggtgt 300  
 gggaccaagc tggagctgaa acgggctgat gct 333

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Unknown Organism

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Unknown Organism:signal sequence

&lt;400&gt; 17

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Gly Thr Ser
1 5 10 15

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Unknown Organism

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Unknown Organism:signal sequence

&lt;400&gt; 18

atgggttggt cttggatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttct

48

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:spacer

&lt;400&gt; 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:spacer

&lt;400&gt; 20

ggcgggtggcg gttctggtgg cgggtgctct ggcgggtggcg gttct

45

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Unknown Organism

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Unknown Organism:antibody recognition site

&lt;400&gt; 21

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Unknown Organism

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Unknown Organism:antibody recognition site

&lt;400&gt; 22

gaacagaagt tgatttctga agaagatttg

30

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Unknown Organism

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Unknown Organism:KDEL signal

&lt;400&gt; 23

Lys Asp Glu Leu

1

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Unknown Organism

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Unknown Organism:KDEL signal

&lt;400&gt; 24

aaggatgaac tt

12

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 279

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 25

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Gly Thr Ser

1 5 10 15

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

20 25 30

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

35 40 45

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

50 55 60

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met

65 70 75 80

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

85 90 95

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val

100 105 110

Arg Gly Tyr Tyr Glu Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn

145 150 155 160

Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys

165 170 175

Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln

180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu

195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp

210 215 220

Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
245 250 255  
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
260 265 270  
Glu Asp Leu Lys Asp Glu Leu  
275

<210> 26  
<211> 840  
<212> DNA  
<213> Calisivirus

```

<400> 26
atgggttggt cttgatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttctga ggtgcagctt 60
caggagtcgg gacctggcct ggtggcgccc tcacagagcc tgtccattac ctgcactgtc 120
tctgggttct cattaaaccag ctatgatata agctggattc gccagccacc aggaaaagggt 180
ctggagtggc ttggagtaat atggactggt ggaggcacia attataattc agctttcatg 240
tccagactga gcatcagcaa ggacaactcc aagagccaag ttttcttaaa aatgaacagt 300
ctgcaaactg atgacacagc catatattac tgtgtaagag gttactacga gggttactat 360
gctatggact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctcaggcgg tggcggttct 420
ggtggcggtg gctctggcgg ttggcggttct gatattgtga cgcaggtctc attctccaat 480
ccagtcactc ttggaacatc agcttccatc tcttcaggt ctagtaagag tctcctgcac 540
agtaatggca tcacttattt gtattggtat ctgcagaagc caggccagtc tctcagctc 600
ctgatttata agatgtccaa cettgcctca ggagtcagg acaggttcag tagcagtggg 660
tcaggaactg atttcacact gagaatcagc agagtggagg ctgaggatgt ggggttttat 720
tactgtgctc aaaaatctaga acttctcgg acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaata 780
aaacgggctg atgctgaaca gaagttgatt tctgaagaag atttgaagga tgaactttaa 840

<210> 27
<211> 282
<212> PRT
<213> Calisivirus

```

<400> 27

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Gly Thr Ser  
1 5 10 15  
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly  
20 25 30  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Phe  
35 40 45  
Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
50 55 60  
Ala Ala Ser Ser Asn Lys Val Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Val  
65 70 75 80  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile  
85 90 95  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr  
100 105 110  
Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Gly Ala Met  
115 120 125  
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130                      135                      140  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr  
                     165                      170                      175  
 Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu His Trp  
                     180                      185                      190  
 Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Gly Thr  
                     195                      200                      205  
 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
                     210                      215                      220  
 Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Met Phe Gly  
                     245                      250                      255  
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Glu Gln Lys Leu  
                     260                      265                      270  
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Lys Asp Glu Leu  
                     275                      280

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 849

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 28

atgggttggt cttggatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttctga ggtgcagctt 60  
 caggagtcgg gaggagcett ggtacagtct ggggttctc tgagactctc ctgtgcaact 120  
 tctgggttca cctcagtga ttctacatg gagtgggtcc gccagcctcc agggaaggga 180  
 ctggagtga ttctgcaag cagtaataaa gttaagtatt atacaacaga gtacagcgtc 240  
 tctgtgaagg gtcggttcat cgtctccaga gacacttccc aaagcctcct ctacctgcag 300  
 atgaatgccc tgagagctga ggacactgcc atttattact gtgcaagaga tggctcctat 360  
 tactacggtg ctagecgtgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420  
 tcaggcgtg gcggttctgg tggcggtggc tctggcggtg gcggttctaa aatagtctc 480  
 acccagtctc cagcaatcat gtctgcatct ctagggggaa gggtcaccat gacctgctct 540  
 gccacctcaa gtgtaagttc cacttacttg cactggtacc gacagaagcc aggatcctcc 600  
 cccaaactct ggatttatgg cacatccaac ctggcttctg ggtcccagc tcgcttcagt 660  
 ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc acaatcagca gcatggaggc tgaagatget 720  
 gccacttatt actgccacca gtatcatcgt tccccgtaca tgttcggagg ggggaccaag 780  
 ctggaaataa aacgggctga tgctgaacag aagttgattt ctgaagaaga tttgaaggat 840  
 gaactttaa 849

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 278

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 29

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Gly Thr Ser  
                     1                      5                      10                      15  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

20 25 30  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 35 40 45  
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 50 55 60  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
 65 70 75 80  
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 85 90 95  
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 100 105 110  
 Ala Thr Gly Asp Lys Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr  
 115 120 125  
 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro  
 145 150 155 160  
 Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser  
 165 170 175  
 Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys  
 180 185 190  
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala  
 195 200 205  
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 210 215 220  
 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 245 250 255  
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu  
 260 265 270  
 Asp Leu Lys Asp Glu Leu  
 275

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 837

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 30

atgggttggt cttgatttt tcttttctt ctttctggtg gtacttctga agtgaagctg 60  
 gtggagtctg gacctgagct ggtgaagcct ggggcttcag tgaagatc ctgcaaggct 120  
 tctggataca cattcactga ctacaacatg gactgggtga agcagagcca tggaaagagc 180  
 cttgagtgga ttgatatat ttatcctaac aatgggtgga ctggctacaa ccagaagttc 240  
 aagagcaagg ccacattgac ttagacaaa tctccagca cagcctacat ggagctccac 300  
 agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa caggggataa acggtggtac 360  
 ttgatgtct gggcgagcagg gaccacggtc accgtctcct cggcggtg cggttctggt 420  
 ggcggtggt ctggcggtg cggttctgat attgtgacgc aggtgcatt ctccaatcca 480  
 gtcactcttg gaacatcagc ttccatctcc tgcaggtcta gtaagagtct cctacatagt 540  
 aatggcatca cttatttgta ttggtatctg cagaagccag gccagctccc tcagctctg 600



atttatcaga tgtccaacct tgcctcagga gtcccagaca ggttcagtag cagtgggtca 660  
 ggaactgatt tcacactgag aatcagcaga gtggaggctg aggatgtggg tgtttattac 720  
 tgtgtcaaaa atctagaact tcctcggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaatcaaaa 780  
 cgggctgatg ctgaacagaa gttgatttct gaagaagatt tgaaggatga actttaa 837

<210> 31

<211> 275

<212> PRT

<213> Calisivirus

<400> 31

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Gly Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 20 25 30  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Tyr  
 35 40 45  
 Phe Met Asn Trp Met Gln Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 50 55 60  
 Gly Arg Ile Asn Gly Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe  
 65 70 75 80  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asp Thr Ala His  
 85 90 95  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Lys Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 100 105 110  
 Ala Arg Leu Asp Asp Tyr Asp Asp Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser  
 165 170 175  
 Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu  
 180 185 190  
 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile  
 195 200 205  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser  
 210 215 220  
 Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 225 230 235 240  
 Gly His Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 245 250 255  
 Lys Arg Ala Asp Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Lys  
 260 265 270  
 Asp Glu Leu  
 275

<210> 32

<211> 828

<212> DNA

## &lt;213&gt; Calisivirus

&lt;400&gt; 32

atgggttggt cttggatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttctga ggtgaagctg 60  
 atggaatctg gacctgaact ggtgaagcct ggggcttcag tgaagatac ctgcaaggct 120  
 tctggttact cattaacgga ctattttatg aattggatgc agcagagcca tggaaagagc 180  
 cttgagtgga ttggacgtat taatggttat aatggtgata ctttctacaa ccagaacttc 240  
 aagggaagg ccacattaac tgtagacaaa tcttctgaca cagccacat ggagctccgg 300  
 agcctgacat ctaaggactc tgcagtctat tattgtgcaa gattggatga ttacgacgac 360  
 gggacggact actggggtca aggaacctca gtcacctct cctcaggcgg tggcggttct 420  
 ggtggcggtg gctctggcgg tggeggttct gacattgtga tgacacagtc tccagccacc 480  
 ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct ctttctgca gggccagcca gattattagc 540  
 gactacttac actggtatca acaaaaatca catgagtctc caaggcttct catcaaatat 600  
 gcttcccaat ccactctctg gatccctcc aggttcagtgc gcagtggatc agggtcagat 660  
 ttactctca gtatcaacag tgtggaacct gaagatgttg gattgtatta ctgtcaaaat 720  
 ggtcacagct tccgctcac gtccggtgct gggaccaagc tggagctgaa acgggctgat 780  
 gctgaacaga agttgatttc tgaagaagat ttgaaggatg aactttta 828

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse immunoglobulin gene

&lt;400&gt; 33

aaggccaac cggccatggc cgakgtcag cttcaggagt crgg 44

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse immunoglobulin gene

&lt;400&gt; 34

aaggccaac cggccatggc ccaggtrcag ctgaagsagt cagg 44

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse immunoglobulin gene

&lt;400&gt; 35

aaggccaac cggccatggc cgaggtcag ctgcarcagt ctgg 44

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse immunoglobulin gene

&lt;400&gt; 36

aaggccaac cggccatggc ccaggccar ctgcagcagy ctgg 44

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse immunoglobulin gene

<400> 37  
 aaggccaac cggccatggc cgargtgaag ctggtggart ctgg 44  
 <210> 38  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 38  
 aaggccaac cggccatggc cgaggtgaag cttctcsagt ctgg 44  
 <210> 39  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 39  
 aaggccaac cggccatggc cgaggttcag cttcagcagt ctgg 44  
 <210> 40  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 40  
 gggcggccgc ccagatccag gggccagtgg atagacaga 39  
 <210> 41  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 41  
 gggcggccgc ccacacacag gggccagtgg atagaccga 39  
 <210> 42  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 42  
 gggcggccgc ccacaccag gggccagtgg atagactga 39  
 <210> 43  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 43  
 gggcggccgc ccgcagccag ggaccaagg atagacaga 39  
 <210> 44  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 44

ccgctagcgg ggacattgtg atgwcwagct ctcc	34
<210> 45	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> mouse immunoglobulin gene	
<400> 45	
ccgctagcga tgttktgrtg acccaract	29
<210> 46	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> mouse immunoglobulin gene	
<400> 46	
ccgctagcga tattgtgatg ackcaggct	29
<210> 47	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> mouse immunoglobulin gene	
<400> 47	
ccgctagcga trttgtgatr acccaggat	29
<210> 48	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> mouse immunoglobulin gene	
<400> 48	
ccgctagcgg tracattgtg ctgacmcart ctcc	34
<210> 49	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> mouse immunoglobulin gene	
<400> 49	
ccgctagcgg asaaawtgtk ctcacccagt ctcca	35
<210> 50	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> mouse immunoglobulin gene	
<400> 50	
ccgctagctg tgacatymag atgachcagt ct	32
<210> 51	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> mouse immunogloblin gene	
<400> 51	
ccgctagctg tgatatmcag atgacacaga ct	32

<210> 52  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 52  
 ccgctagctg tgatattgtg ctaactcagt ct 32  
 <210> 53  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 53  
 ccgctagctg tsaaattgtk ctcwcccagt ctcca 35  
 <210> 54  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> mouse immunoglobulin gene

<400> 54  
 ggggcgcgcc taactgctca ctggatggtg ggaagat 37  
 <210> 55  
 <211> 68  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 55  
 atgggttggt cttggatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttctga ggtgcagctt 60  
 caggagtc 68  
 <210> 56  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 56  
 ttaaagttca tccttcaaatt cttcttcaga aatcaacttc tgttcagcat cagcccgctt 60  
 tatttc 66  
 <210> 57  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 57

ccgccagagc caccgccacc agaaccgccca ccgcctgagg agacggtgac

50

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 58

tctggtggcg gtggctctgg cggtagcggt tctgatattg tgacgcag

48

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 59

tctggtggcg gtggctctgg cggtagcggt tctaaaatag ttctcacc

48

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 66

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 60

atgggttggt cttggatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttctga agtgaagctg 60  
gtggag 66

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 65

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 61

atgggttggt cttggatttt tctttttctt ctttctggtg gtacttctga ggtgaagctg 60  
atgga 65

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 62

tctggtggcg gtggctctgg cgtggcggt tctgacattg tgatgac

47

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 63

ttaaagtcca tccttcaaatt cttcttcaga aatcaacttc tggcagcat cagccggtt 60

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 64

cccgggatgg gttggtcttg gatt

24

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 65

gagctcttaa agttcatcct tcaaattc

28

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 66

gagctcttac aaatcttctt caga

24

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 67

gaattcaatg ggttggtctt ggat

24

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 68

aagcttaagt tcatacttca aatc

24

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 69

ccccgggttaa agttcatcct tcaaattcttc ttcagaaatc

40

【図面の簡単な説明】

【図1】バキュロウイルスが産生する抗体のカリシウイルスに対する反応性を確認した図面である。

【図2】抗カリシ抗体遺伝子を導入したタバコ由来物におけるELISAの結果を示した図面である。

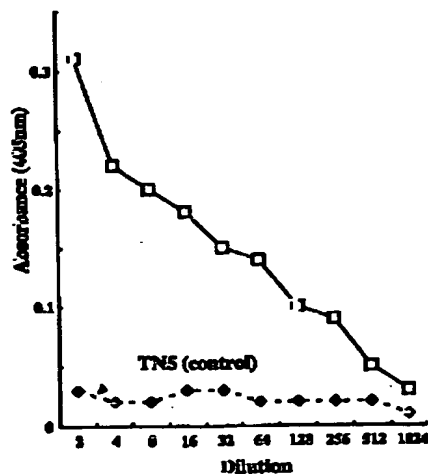
【図3】抗カリシ抗体遺伝子を導入したタバコ由来物におけるウェスタン検定の電気泳動像を示した図面である。

【図4】植物発現抗体の精製結果を、SDS-PAGE後の銀染色で示した図面である。

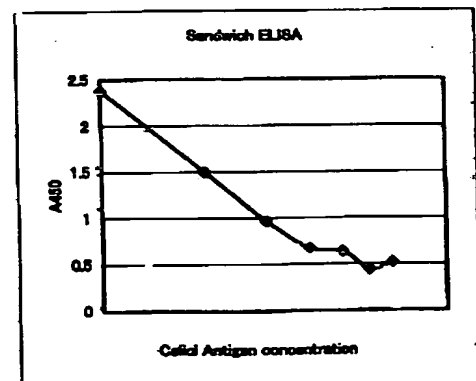
【図5】本抗カリシ抗体を用いて構築したELISAにより得られた検量線を示した図面である。

【図6】金コロイド標識抗カリシ抗体を用いたイムノクロマトグラフィーによる検出結果を示した発色像を示した図面である。

【図1】



【図5】

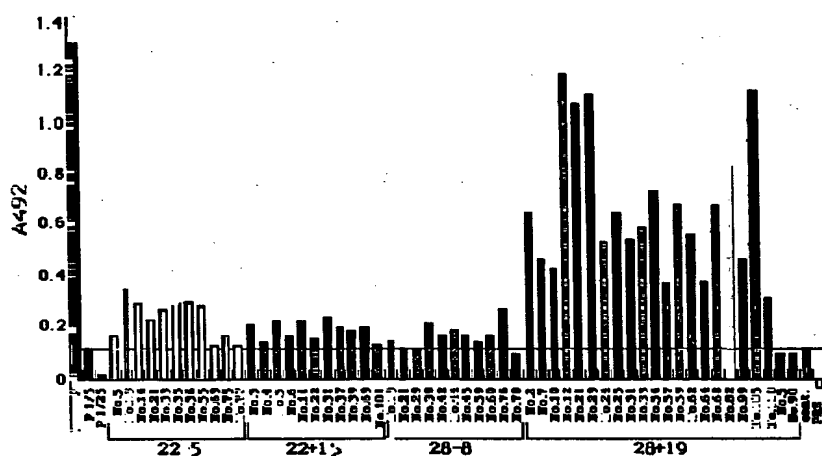


1st capture Antibody: 1 ug / ml

2nd Capture Antibody: 10 ug / ml

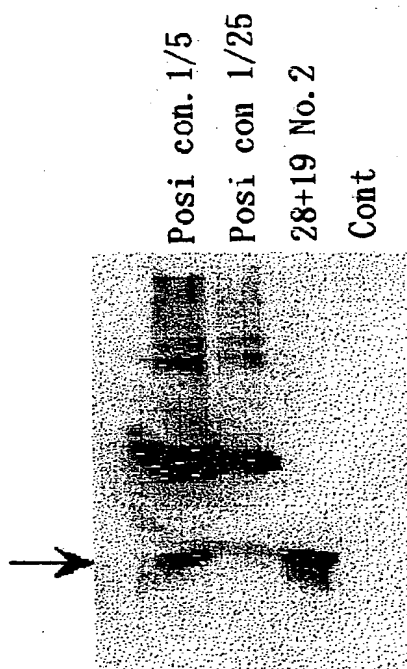


【図2】



抗c-myc抗体を用いた抗カリシウイルスモノクローナル抗体遺伝子導入植物のELISA。  
 22-5、22+15、28-8、28+19はそれぞれ導入した遺伝子を、各No. は組換えタバコの個体No. を示す。  
 P:大腸菌発現一本鎖抗体、cont.:非組換えタバコ、PBS:緩衝液

【図3】

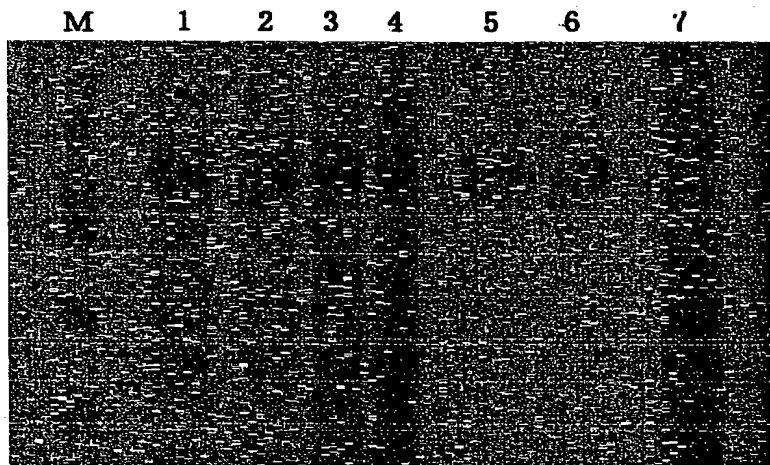


抗カリシウイルスモノクローナル抗体  
 遺伝子導入タバコのウエスタン検定。

1次抗体：抗c-myc(9E10)マウス抗体  
 2次抗体：抗マウスIgGヤギ抗体HRPO標識  
 矢印は、単一鎖抗体の位置を示す。  
 Posiは、大腸菌発現抗体蛋白質  
 Contは、非組換えタバコを示す。

【図4】

植物発現抗体の精製系の確立 (SDS-PAGE後銀染色)

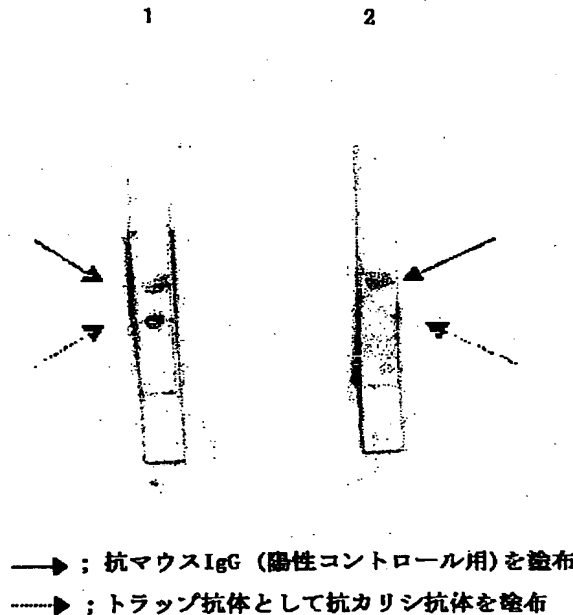


M; 分子量マーカー

1. DEAEイオン交換step wise による精製画分 0.1M NaCl
2. 同上 0.2M NaCl
3. 同上 0.3 M NaCl
4. 同上 0.4M NaCl
5. 1-4までをpool して c-myc Tag Affinity精製 Fraction 1
6. 同上c-myc Tag Affinity Fraction 2
7. 抗体を発現したTobacco leaf の硫酸沈殿物をTris緩衝液に懸濁したもの

【図6】

金コロイド標識抗カリシ抗体を使用したイムノクロマトグラフィーによる検出系



1. カリシウイルス検出 (抗マウスIgG 及びトラップ抗体の位置に赤紫のスポットを呈する)
2. ウイルス検出なし (抗マウスIgGのみに赤紫のスポットを呈する)

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N 33/569		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
33/577		C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 P 21/08		5/00	C
(71)出願人 599089664		(72)発明者 加藤 美穂子	
上田 一郎		北海道石狩市新港西1丁目777番地13号	
北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道		株式会社サイエスタナカ内	
大学農学部内		(72)発明者 杉本 千尋	
(72)発明者 松村 健		北海道帯広市稲田町西2線13番地 畜大宿	
北海道夕張郡長沼町東5線北15号 株式会		舎5号	
社北海道グリーンバイオ研究所内		(72)発明者 土田 一郎	
(72)発明者 一町田 紀子		北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道	
北海道夕張郡長沼町東5線北15号 株式会		大学内	
社北海道グリーンバイオ研究所内		(72)発明者 大橋 和彦	
(72)発明者 伊藤 敬三		北海道札幌市北区北18条西9丁目 北海道	
北海道石狩市新港西1丁目777番地13号		大学内	
株式会社サイエスタナカ内			

(72) 発明者 李 成一  
北海道札幌市北区北18条西9丁目 北海道  
大学内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA06 CA17  
CA19 CB02 CD03 CD06 CD10  
CD13 CD17 CD21  
4B024 AA01 AA08 AA11 BA51 CA01  
DA01 EA04 GA30 HA15  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ10  
QQ96 QR48 QR55 QS33 QX01  
4B064 AG27 CA11 CA19 CC24 DA01  
DA15  
4B065 AA89X AA90Y AB01 AC14  
BA02 CA25 CA44 CA46  
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA52  
FA74